第5卷第4期
1984年11月

动 物 学 研 究
ZOOLOGICAL RESEARCH

Vol.5, No. 4
Nov., 1984

小鼠杂交细胞生物学特征的观察

叶银英 茅一萍 鲁晓萱 王世浚

（南京铁道医学院生物学教研室）

摘 要

本文用小鼠NS—1骨髓瘤细胞与小鼠脾淋巴细胞经PEG介导进行融合，通过HAT选择，有成效地获得了同种杂种细胞。在融合后第30、50、70、90天观察了杂种细胞的染色体畸变和同期细胞核损伤，并对亲本和杂种细胞的染色体核型、带型（G带、C带）进行了比较。

结果表明：NS—1细胞系的染色体平均数为64.2条，有一条标记性的亚中着丝粒染色体及一条微小染色体。小鼠脾淋巴细胞染色体为2n=40，全部为端着丝粒染色体。NS—1/小鼠脾淋巴细胞融合后的杂种细胞，染色体平均数随融合后杂种的传代而逐渐减少。到第70天时已稳定，平均为80.7±6.2条。同时，随融合后传代，杂种细胞染色体畸变率和核碎裂也增加。

最后对染色体丢失的机理及意义以及饲养细胞在融合中的作用进行了初步讨论。

体细胞杂交打破了物种屏障。自1964年Littlefield 利用焦磷酸化酶缺陷的A_3—1细胞和胸苷激酶缺陷的B_{34}细胞进行了细胞杂交，结合HAT选择培养基方法，有成效地把杂种细胞选择出来之后，这方面的工作发展很快，它已广泛用于人的基因定位和单克隆抗体的选择等方面的工作。

细胞的自发融合是罕见的现象，但是经融合剂（灭活的仙台病毒，聚乙二醇等）介导就能大大提高融合率。Schroder用大鼠淋巴细胞（2n=40）与小鼠$P_3\times63$—Ag8骨髓瘤细胞系（63—64条染色体）融合，得到杂种细胞的染色体为74和89条的细胞克隆。随着杂种细胞的传代，亲本细胞一方的染色体逐渐丢失并伴有染色体畸变和核的改变。

我们用小鼠NS—1骨髓瘤细胞与小鼠（BALB/C)脾淋巴细胞融合，通过HAT选择已成效地获得了NS—1与BALB/C淋巴细胞杂交种，并进行了亲本和杂种细胞染色体组型和带型的比较，以及观察了融合后90天内杂种细胞的染色体畸变和核损伤。

本文1982年9月25日收到，1983年7月28日收到修改稿。

材料和方法

（一）亲本细胞

1. NS—1细胞系 小鼠NS—1骨髓瘤细胞系（HGPRT酶缺陷型，于1982年引自中国科学院细胞生物学研究所）培养于含有15%小牛血清和25μg/ml 8—氮鸟嘌呤及抗生素（青霉素100单位/ml，链霉素100单位/ml）的RPMI 1640培养液中。该培养液用Hepes液和5%$NaHCO_3$调节pH到6.8—6.9。（这样的pH条件最适合于NS—1细胞系的生长而它对pH偏碱的培养液耐受性较差）。细胞每3—4天进行一次传代。

该细胞系的核型，平均数为64.2条：其中一条为亚中着丝粒染色体；一条为微小染色体；其余为端着丝粒染色体。

2.小鼠淋巴细胞 断头处死小鼠后经70%酒精全身浸泡消毒，剖腹取出脾脏，放入加有5—10ml 1640培养液的消毒小培养皿中，用弯曲的大号针头挤压小鼠脾脏；然后用吸管吹打细胞，使成悬液，自然沉淀约2—3分钟，上层悬液吸入一离心管，经过离心沉淀，取离心管底部结成小团块的淋巴细胞。分析核型2n=40，全部为端着丝粒染色体。

（二）细胞融合和选择

1. 50%聚乙二醇（PEG）溶液 用荷兰（Chrompack—MW1500）PEG经高压消毒后加入等体积预热无小牛血清的RPMI 1640培养液，未调pH。

2.次黄嘌呤(H)、氨基喋呤(A)、胸腺嘧啶核苷(T)、选择液(HAT) 称取次黄嘌呤68.05mg和胸腺嘧啶核苷18.9mg，在45—50°C水浴中溶于50ml双蒸水中，微孔滤器（Milipore）过滤除菌，低温冰箱保存。

称取0.88mg氨基喋呤，溶于含有0.25ml 1*N* NaOH的50ml双蒸水中，用0.25ml 1*N* HCl中和，除菌过滤，低温冰箱保存。

3.细胞融合及选择程序 融合的前一天，更换NS—1亲本细胞培养液一次，使它处于对数生长期。将NS—1细胞（10^7）与BALB/C小鼠脾淋巴细胞（10^8）混合，离心去上清液，再轻轻摇匀，缓慢滴入50%PEG溶液0.7ml，边加边摇，使细胞与PEG溶液充分混合，在1分钟内滴完。随后将细胞悬液于37°C下静置90秒钟。再用10ml预热过的无小牛血清的1640培养液沿管壁由慢到快加入，1.5分钟内加完；然后用螺旋式搅拌终止PEG的作用。离心后加入有饲养细胞（BALB/C小鼠的腹腔巨噬细胞5×10^6）的HAT培养液。（1×10^{-4}*M*次黄嘌呤；4×10^{-8}*M*氨基喋呤；1.6×10^{-5}*M*胸腺嘧啶核苷）。然后进行分瓶培养。淋巴细胞不贴壁，经HAT选择后也可以陶汰。14天后再用HT培养液继续进行培养。

（三）细胞生物学分析

1. NS—1×L杂种细胞的选择 NS—1骨髓瘤细胞不具有HGPRT酶，在HAT选择培养基中不能生长；而杂种细胞由于从小鼠脾淋巴细胞中获得了HGPRT酶，因而可以继续生长。将已选出的NS—1×L杂种细胞重新接种在HAT选择液中，同时取同样量的NS—1骨髓瘤细胞接种入HAT液作对照。每三天更换一次HAT液，每天观察细胞

生长情况。

2.染色体组型和带型　按常规方法进行染色体制片，按着丝粒位置及染色体大小进行了核型分析，并观察了亲本和杂种细胞的G带和C带。G带按Seabright的胰酶处理法略加修改：将制备后4—7天的染色体标本放置在37°C培养箱中预热3—4小时后，在37°C pH7.4—7.5的0.025%胰酶溶液中处理15—45秒，经蒸馏水冲洗，1：4 Giemsa液染色10—15分钟。C带用5%过饱和氢氧化钡溶液处理。

3.杂种细胞染色体畸变和核碎裂　细胞融合后第30、50、70、90天按常规进行染色体制片，观察计数每一时间点上的100个中期分裂相和1000个间期核，统计出染色体畸变率及核碎裂百分率。

结　果

（一）NS—1×L 杂种细胞的选择

NS—1骨髓瘤细胞在融合前一星期用25μg/ml 8—氮鸟嘌呤选择，看有无恢复突变细胞，再在HAT选择培养液中培养，细胞在一周内逐渐死亡。但NS—1×L杂交细胞在HAT选择培养液中却照常增殖生长。根据HAT选择原理，推测杂种细胞也具有了HGPRT酶。

（二）NS—1×L 杂种细胞与NS—1亲本细胞染色体数目的比较

1.染色体数目和形态特征　NS—1细胞系的染色体平均数为64.2条：其中有一条标记性的亚中着丝粒染色体；一条微小染色体；其余均为端着丝粒染色体。（见图1）

正常BALB/C小鼠脾淋巴细胞染色体数为2n=40条，全部为端着丝粒染色体。

融合后第50天时，融合细胞染色体的平均数为86.5条，其中也有一条标记性亚中着丝粒染色体和一条微小染色体（图2）。

2.染色体带型比较　从G带可见（图1）：亲本NS—1细胞系大多数染色体的着丝粒区均显示深带，特别是标记性的亚中着丝粒染色体更为明显，在其短臂末端有二小点异染色质区。在NS—1×L杂种细胞中可见同样的G带特征（图1—2）。

从C带可见（图2）：无论是亲本NS—1细胞或是NS—1×L杂种细胞，每条染色体着丝粒区均显示深带，标记性的亚中着丝粒染色体更为清楚。因此，亲本NS—1与杂种细胞的C带特征也相同。

结论　从HGPRT酶；染色体数目和特征；G带和C带比较分析，均可证明NS—1×L细胞系确实是NS—1骨髓瘤细胞系与BALB/C小鼠脾淋巴细胞的杂种细胞。

（三）杂种细胞的染色体畸变和核的改变

我们通过体外传代，在融合后第30天检查NS—1/小鼠淋巴细胞杂种细胞染色体时，可见染色体平均数为86.5±7.1条；第50天时，杂种细胞染色体平均数为84.9±5.2条；第70天时杂种细胞染色体平均数为80.7±6.2；第90天时为81.1±5.5条。（见表）由表可见，融合后早期染色体数目有逐渐下降的趋势。同时也可看出，随着融合后杂种细胞的传代，染色体畸变，如：环、断片以及间期细胞核的核碎裂均有所增加。

表 杂种细胞的染色体分布、染色体畸变及间期细胞核损伤

杂种细胞的年龄（天）	染色体数（条）	染色体畸变（%）		间期核核碎裂%
		环	断片	
30	86.5±7.1	1	3	0.7
50	84.9±5.2	1	3	1.5
70	80.7±6.2	3	9	8.19
90	81.1±5.5	4.5	7.5	2.73

讨 论

Engel等（1969）在同种细胞杂交中可见到杂种细胞染色体逐渐减少的同时伴有染色体畸变和核粉碎化的增加。此后，许多人也证实这一现象，并认为杂种细胞染色体丢失与染色体畸变及核碎裂有一定因果关系。我们的实验中可见到染色体逐渐减少时，伴有染色体畸变（环及碎片）及间期核碎裂的增加（见图3及表），我们也认为染色体畸变与染色体丢失有一定关系。

Schall（1978）用人Hela细胞与小鼠3T_3细胞系杂交，观察到人染色体非同步化的凝聚（asynchronous condensed human chromosomes）简称ACC。他认为染色体丢失与ACC的出现有相关性。在我们的同种杂交试验中也观察到这种现象（图3—3）。ACC的产生是由于大多数染色体都开始DNA复制，而这条处于GI期的染色体在整个细胞进入M期时，提前凝集。因而，染色体一方丢失以后，很快ACC频率达到最大值，随后下降。

在细胞融合后的培养及杂种细胞克隆化过程中，加入小鼠腹腔巨噬细胞有利于杂种克隆的生长繁殖，加入的巨噬细胞称“饲养细胞”。饲养细胞有两个作用：一是单个或少量分散的细胞不易生存与繁殖；加入巨噬细胞能起“饲养作用”，使之容易繁殖与生存；二是巨噬细胞能清除培养中的死细胞，从而促进单个细胞克隆的生长。Fazekas等（1980）也证实在融合前一天在培养板中先加入2×10^4巨噬细胞/每孔，能大大提高克隆生长率。我们的实验每次加入3×10^4/ml腹腔巨噬细胞，比未加巨噬细胞的组，培养物背景干净、生长良好。同样说明加入巨噬细胞对克隆生长有好处。

参考文献

刘尔翔 1980《国内外医学科学研究进展》74—81
吴曼等 1964《天津医学杂志》输血液学附刊。
Engel E. *et al.* 1969 *J Cell Sci* 5: 93—119.
Fazekas S. *et al.* 1980 *J Immunol Meth* 35: 1.
Gage R. *et al.* 1972 *Exp Cell Res* 73: 239.
Harris H. *et al.* 1965 *Nature* 205: 640—646.
Littlepield JW 1964 *Science* 145: 709—710.
Schall D. *et al.* 1978 *Somat Cell Genet* 4: 661—676.
Schroder J. *et al.* 1980 *Immunngenet* 10: 125—131.
Seabright M 1971 *Lancet* 30: 971—972.
Yoshida MC 1972 *Japan J Genet* 47: 447—449.

THE OBSERVATION OF BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF HYBRID CELL IN MICE

Ye Yinying Mao Yiping Lu Xiaoxuan Wang Shijuan

(Department of Biology, Nanjing Railwoy Medical College, Nanjing, China)

Cell fusion between mouse myeloma NS -I and mouse spleen cells was induced by polyethylene glycol (PEG). Hyrid cells were successfully obtained by HAT medium. The hybridcell population were examined 30, 50, 70 and 90 days after fusion, The G-, C- banding and the frequencies of chromosomal aberrations in parental and hybrid cells were then compared.

The results indicated that the mean number of chromosome in myeloma NS — 1 cell line is 64.2 including a submetacentric marker chromosome. L cell was 2n=40. The chromosome number of hybrid cells decreased gradually with the generations, while the chromosomal structural aberrations increased and reached a stable number of 80.8 on the seventieth day after fusion.

叶银英等：小鼠杂交细胞生物学特征的观察

Ye Yinying et al.: The Observation of Biological Characteristics of Hybrid Cell in Mice



图 1—1，NS—1，G带　图 1—2　NS—1×L，G带

图 2—1，NS—1，C带　图 2—2　NS—1×L，C带

叶银英等：小鼠杂交细胞生物学特征的观察

Ye Yinying et al.: The Observation of Biological Characteristics of Hybrid Cell in Mice

3-1

3-2

3-3

图 3－1，NS－1×L（染色体粉碎化）

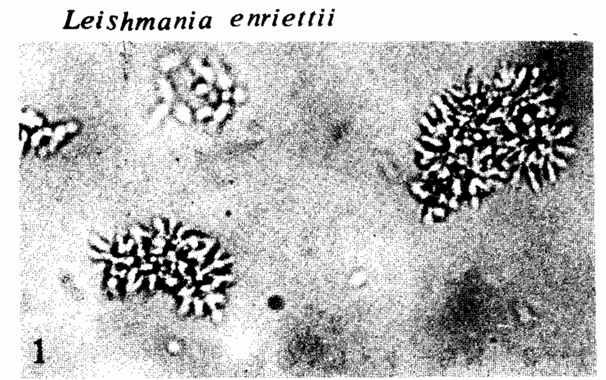
图 3－2，NS－1×L（间期核碎裂）

图 3－3，NS－1×L（ACC和环）

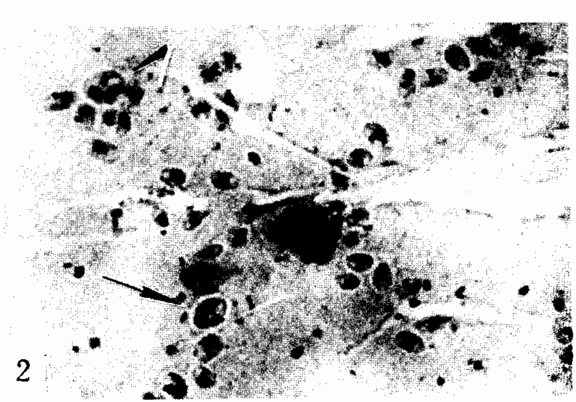
放大倍数均为95×10×3.7＝3543×

王捷等：豚鼠利什曼原虫生长和形态的观察

Wang Jie et al.: Some Observations on the Growth and Morphology of *Leishmania enriettii*



1.NNN基培养150天转种出的原虫仍然生长良好



2.核分裂完毕的豚鼠利什曼无鞭毛体